



**การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสำหรับเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่
(*Carissa carandas* Linn.) โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง
Optimization of Extraction Conditions for Improving Bioactive Compounds
and Antioxidant Activities from Karonda (*Carissa carandas* Linn.)**

Fruits Using Response Surface Methodology

พิชิต โชดก¹ และ สุพิชญา คำคม^{2*}

Pichit Chodok¹ and Supichaya Khumkhom^{2*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

² สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

¹ Division of Plant Production Technology, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University

² Division of Home Economics, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University

Received : 28 August 2019

Revised : 12 November 2019

Accepted : 6 December 2019

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่ออกแบบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) จากผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* Linn.) โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต 5 ปัจจัย 5 ระดับ (-2, -1, 0, +1 และ +2) ที่ประกอบด้วย 50 การทดลอง ผลของการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (1:20-1:100 กรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นของเอทานอล (60.0-100.0 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (0.0-0.8 เปอร์เซ็นต์) เวลาในการสกัด (1.0-3.0 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการสกัด (20.0-60.0 องศาเซลเซียส) มีผลต่อค่าตอบสนองทั้ง 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด คือ อัตราส่วนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล 1:80 กรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.6 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ในการสกัด 2.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิในการสกัด 50 องศาเซลเซียส สำหรับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (17.80 mg GAE/g) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (29.28 mg RE/g), FRAP (30.52 mg TE/g) และ ABTS^{•+} (20.24 mg TE/g) ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองนี้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย (17.48 mg GAE/g, 28.59 mg RE/g, 30.80 mg TE/g และ 19.86 mg TE/g ตามลำดับ)

คำสำคัญ : มะม่วงหาวมะนาวโห่, สารฟีนอลิกทั้งหมด, สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, วิธีพื้นผิวตอบสนอง

*Corresponding author. E-mail : supichaya_culinary@hotmail.com



Abstract

This study for the first time designed to optimize the extraction conditions of total phenolic content, total flavonoid content and ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺⁺) scavenging activities from fruits of karonda (*Carissa carandas* Linn.) using response surface methodology (RSM). For the optimization, a five-factors-five-level (-2, -1, 0, +1 and +2), central composite design (CCD) including 50 experimental runs. Analysis of variance (ANOVA) results showed that the solid-liquid ratio (1:20-1:100 g/mL), ethanol concentration (60.0-100.0%), HCl concentration (0.0-0.8%), extraction time (1.0-3.0 h) and extraction temperature (20.0-60.0 °C) significantly ($p < 0.05$) affected all responses. The optimized extraction conditions were solid-liquid ratio of 1:80 g/mL, ethanol concentration of 70%, HCl concentration of 0.6%, extraction time of 2.5 h and extraction temperature of 50°C for total phenolic content (17.80 mg/g), total flavonoid content (29.28 mg/g), FRAP (30.52 mg TE/g) and ABTS⁺⁺ scavenging activities (20.24 mg TE/g). These experimental values fit well with the predicted values (17.48 mg/g, 28.59 mg/g, 30.80 mg TE/g and 19.86 mg TE/g, respectively).

Keywords : *Carissa carandas* Linn., total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activities, response surface methodology

บทนำ

ในปัจจุบันพบว่าพฤติกรรมกรรมการบริโภคผลไม้เพื่อสุขภาพ และมีประโยชน์ที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความสำคัญของสุขภาพและความงาม จึงได้ให้ความสำคัญกับอนุมูลอิสระ (Free radical) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และวิตามินซี เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอม เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคชรา โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Phansawan, 2013) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถหยุดยั้งอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเหล่านี้ได้ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และวิตามินซีพบมากในผักและผลไม้ที่มีสีสด ตัวอย่างเช่น มะม่วงหาวมะนาวโห่ (Sarkar *et al.*, 2018) หมากเม่า (Nuengchamnon & Ingkaninan, 2010) และลูกหว่า (Panghal *et al.*, 2019) เป็นต้น

มะม่วงหาวมะนาวโห่ หรือหนามแดงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Carissa carandas* Linn. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae เป็นผลไม้พื้นบ้านโบราณที่ออกผลได้ตลอดทั้งปี ลักษณะผลรีและเรียบ ผลอ่อนจะมีสีชมพูอ่อน เมื่อสุกแก่จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงดำ มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นผลไม้เพื่อสุขภาพที่มีประโยชน์ และมีสรรพคุณทางยา เนื่องจากอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน (ซึ่งพบมากในผลสีม่วงดำ) (Sarkar *et al.*, 2018) การรับประทานผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีผลยับยั้ง และป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่าง ๆ ได้แก่ ป้องกันโรคเบาหวาน (Itankar *et al.*, 2011) ต้านอนุมูลอิสระ (Kubola *et al.*, 2011; Dhodi *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2018) ต้านความเหนียวล้า (Arif *et al.*, 2013) และป้องกันโรคมะเร็ง (Gupta *et al.*, 2014) จากประโยชน์และความสำคัญของมะม่วงหาว

มะนาวให้จึงทำให้ผู้บริโภคหันมาสนใจผลไม้ชนิดนี้กันมากขึ้น รวมทั้งยังนิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น มะม่วงหาวมะนาวโห่ดอง แครอท เยลลี่ และเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เกษตรกรเก็บมาจำหน่ายมักจะมีลักษณะผลสีเขียวชมพูและชมพูแดงผสมรวมกัน ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่จะเลือกซื้อมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูแดงมากกว่า จึงทำให้ผลสีเขียวชมพูไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ราคาต่ำ และจำหน่ายได้น้อย จนกลายเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู (ผลดิบ) ยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าในเภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารเสริมเพื่อสุขภาพต่อไป

ปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ เช่น ตัวทำละลาย และความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลา เป็นต้น ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุพืช (Belwal *et al.*, 2016; Ryu & Koh, 2018; Chen *et al.*, 2018) ซึ่งการทดลองศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางเคมีกายภาพสำหรับการสกัดสารในอดีตจะทำการศึกษาทีละปัจจัย (one-factor-at-a-time) ซึ่งเป็นการทดลองที่ศึกษาเฉพาะปัจจัยที่สนใจ โดยกำหนดให้ปัจจัยอื่น ๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษา และเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยที่สอง และทำอย่างนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา ข้อดีของการศึกษาทีละปัจจัย คือ ขั้นตอนของการทดลองง่าย และไม่ยุ่งยาก ในขณะที่ข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบถึงผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลร่วมกัน (Interaction) ได้ รวมทั้งหากทำการศึกษาในหลายปัจจัยในเวลาเดียวกัน การทดลองจะใช้เวลาและผลจากการทดลองที่ได้ อาจจะไม่ใช่ผลการทดลองที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทดลองทางสถิติเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยการใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลา และทรัพยากรที่ใช้ในการทดลอง วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นกระบวนการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนอง ซึ่งจะใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง โดยการวางแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต (Central composite design, CCD) เป็นการพัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^n factorial design) อย่างไรก็ตามการวางแผนการทดลองแบบ CCD ได้เพิ่มระดับการทดลองแฟคทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (Center) และแนวแกน (Axial) โดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง ($+1$) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) เพื่อให้สามารถสร้างรูปแบบของความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ และการวางแผนการทดลองแบบ CCD ที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 5 ตัวแปร พบว่าจะมีชุดการทดลองทั้งหมด 50 การทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับ 3^n factorial designs จะมีชุดการทดลองมากถึง 234 การทดลอง จะเห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองโดยการวางแผนการทดลองแบบ CCD จะช่วยลดจำนวนชุดของการทดลองให้สามารถศึกษาผลของปัจจัยหรือตัวแปรได้อย่างรวดเร็ว และทราบถึงผลของปัจจัยที่มีอิทธิพลร่วมกัน รวมทั้งลดการใช้ทรัพยากรในการทดลองให้น้อยลง สำหรับการประยุกต์ใช้วิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD ในงานวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุพืช ตัวอย่างเช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผล *Feronia limonia* (Ilaiyaraja *et al.*, 2015) ถั่วดำ (black soybean) (Ryu & Koh, 2018) และผล *Lycium ruthenicum* Murr. (Chen *et al.*, 2018) เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู (ผลดิบ) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในสภาวะกรดด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD จำนวน 5 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล ความเข้มข้นของเอทานอล ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก เวลาที่ใช้ในการสกัด และอุณหภูมิในการสกัด และแบ่งระดับของปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ (-2, -1, 0, +1 และ +2) รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าในเภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารเสริมเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมผงมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูอบแห้ง

นำมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู (ผลดิบ) ซึ่งซื้อมาจากเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วงหาวมะนาวโห่ จังหวัดกาญจนบุรี นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และทำการแยกเนื้อกับเมล็ดออกจากกัน หลังจากนั้นนำเนื้อมะม่วงหาวมะนาวโห่ไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเนื้อแห้งแล้วนำมาปั่นให้เป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (blender) และร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 30 mesh หลังจากนั้นบรรจุลงในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content, TPC) ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content, TFC) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} โดยทำการศึกษาปัจจัยของการสกัดจำนวน 5 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (1 กรัมต่อ A มิลลิลิตร โดยที่ A คือปริมาตรของเอทานอล) (A, 20.0-100.0 มิลลิลิตร) ความเข้มข้นของเอทานอล (B, 60.0-100.0 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C, 0.0-0.8 เปอร์เซ็นต์) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D, 1.0-3.0 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการสกัด (E, 20.0-60.0 องศาเซลเซียส) โดยแบ่งระดับของปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ คือ -2, -1, 0, +1 และ +2 และมีจำนวนชุดการทดลองทั้งหมด 50 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 1 เมื่อทำการสกัดเสร็จในแต่ละชุดการทดลองแล้วให้นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf centrifuge 5810R, Germany) ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกสารสกัดส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} และนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูล ความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจปรับแก้ (Adjusted R^2) สัมประสิทธิ์ของความผันแปร (Coefficient of variation, C.V.(%)) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เพื่อนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ สำหรับทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} ในรูปสมการที่ 1



$$Y_{(Response)} = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_5E + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{14}AD + \beta_{15}AE + \beta_{23}BC + \beta_{24}BD + \beta_{25}BE + \beta_{34}CD + \beta_{35}CE + \beta_{45}DE + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2 + \beta_{55}E^2 \quad (1)$$

เมื่อ Y คือ ผลการตอบสนอง ได้แก่ TPC (mg GAE/g), TFC (mg RE/g), FRAP (mg TE/g) และ ABTS^{•+} (mg TE/g) และ A, B, C, D และ E คือ ตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา ส่วน β_0 คือ ค่าคงที่สมการ, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ และ β_5 คือ สัมประสิทธิ์ของสมการเส้นตรง, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{15}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{25}, \beta_{34}, \beta_{35}$ และ β_{45} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการปฏิสัมพันธ์ และ $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ และ β_{55} คือ สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสอง

เมื่อได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์แล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติของ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} และหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS สูงสุดด้วยโปรแกรม Design-Expert Version 8.0.3 trial (Stat Ease Inc., MN, USA)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ (1) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ตามวิธีการของ Shao *et al.* (2014) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (PerkinElmer UV/VIS spectrometer Lambda 25, USA) และคำนวณหา TPC จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent: GAE) ในรูปของมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้งของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (mg GAE/g) และ (2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric ตามวิธีการของ Kubola *et al.* (2011) และคำนวณปริมาณ TFC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของรูทีน (Rutin equivalent: RE) ในรูปของมิลลิกรัมสมมูลย์ของลูทีนต่อกรัมน้ำหนักแห้งของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (mg RE/g)

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู

นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย (1) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ (2) วิธี ABTS^{•+} radical cation inhibition antioxidant (ABTS^{•+}) ตามวิธีการของ Belwal *et al.* (2016) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} ในรูปของมิลลิกรัมสมมูลย์ของ Trolox (Trolox equivalent, TE) ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (mg TE/g)

ผลการวิจัย

1. ผลของสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในสกัด (E) ต่อปริมาณ TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD จำนวน 50 การทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าการสกัดสารออกฤทธิ์



ทางชีวภาพจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูในแต่ละชุดการทดลองมีปริมาณ TPC, TFC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺ แตกต่างกันในช่วง 7.07-17.88 mg GAE/g, 2.04-29.52 mg RE/g, 10.74-30.84 mg TE/g และ 6.55-20.25 mg TE/g ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺ ของสารสกัดในแต่ละการทดลอง

Run	Factors					TPC	TFC	FRAP	ABTS ⁺
	A	B	C	D	E	(mg GAE/g) Experimental (Predicted)	(mg RE/g) Experimental (Predicted)	(mg TE/g) Experimental (Predicted)	(mg TE/g) Experimental (Predicted)
1	40	70	0.2	1.5	30	8.42(8.45)	14.33(14.88)	13.16(12.75)	10.55(10.08)
2	80	70	0.2	1.5	30	9.83(10.05)	19.37(18.51)	16.28(16.14)	12.13(11.73)
3	40	90	0.2	1.5	30	7.07(7.78)	6.46(7.11)	10.74(11.30)	6.70(7.65)
4	80	90	0.2	1.5	30	10.71(10.12)	6.82(7.19)	14.35(13.38)	8.25(8.09)
5	40	70	0.6	1.5	30	9.29(9.66)	15.76(16.10)	15.44(15.61)	8.90(9.16)
6	80	70	0.6	1.5	30	12.13(11.58)	18.90(19.35)	19.72(19.96)	10.87(11.45)
7	40	90	0.6	1.5	30	8.49(8.71)	6.70(6.97)	13.75(13.78)	6.55(6.89)
8	80	90	0.6	1.5	30	11.75(11.37)	6.31(6.65)	17.08(16.82)	8.23(7.97)
9	40	70	0.2	2.5	30	8.28(8.33)	14.53(14.47)	13.76(14.00)	9.88(9.67)
10	80	70	0.2	2.5	30	10.76(10.31)	18.44(18.17)	18.02(18.07)	12.36(12.76)
11	40	90	0.2	2.5	30	7.87(7.40)	7.71(7.61)	12.02(12.56)	7.37(6.88)
12	80	90	0.2	2.5	30	9.81(10.12)	7.18(7.75)	14.94(15.32)	8.08(8.74)
13	40	70	0.6	2.5	30	9.87(9.80)	15.51(16.26)	16.42(17.13)	9.29(9.84)
14	80	70	0.6	2.5	30	12.16(12.10)	18.82(19.57)	22.82(22.16)	13.28(13.56)
15	40	90	0.6	2.5	30	8.48(8.59)	7.68(8.03)	15.89(15.31)	7.10(7.19)
16	80	90	0.6	2.5	30	11.15(11.63)	8.57(7.78)	18.89(19.03)	10.24(9.70)
17	40	70	0.2	1.5	50	9.83(9.75)	15.09(16.61)	16.59(17.08)	12.05(12.77)
18	80	70	0.2	1.5	50	13.47(12.89)	26.79(25.37)	22.86(23.05)	15.40(16.04)
19	40	90	0.2	1.5	50	9.03(8.77)	7.55(6.68)	14.60(14.60)	9.84(9.44)
20	80	90	0.2	1.5	50	12.53(12.65)	11.46(11.88)	20.10(19.26)	12.32(11.49)
21	40	70	0.6	1.5	50	12.48(12.02)	19.51(18.60)	22.59(21.96)	13.01(12.37)
22	80	70	0.6	1.5	50	15.13(15.49)	25.47(26.97)	29.97(28.89)	16.22(16.28)
23	40	90	0.6	1.5	50	10.57(10.76)	6.57(7.29)	19.40(19.09)	9.18(9.20)
24	80	90	0.6	1.5	50	14.83(14.97)	12.82(12.10)	24.45(24.72)	11.19(11.89)
25	40	70	0.2	2.5	50	10.93(11.10)	17.55(17.60)	18.42(18.03)	13.62(13.84)
26	80	70	0.2	2.5	50	14.91(14.63)	26.02(26.42)	24.85(24.69)	19.24(18.54)
27	40	90	0.2	2.5	50	9.52(9.86)	9.31(8.58)	15.67(15.56)	10.22(10.13)



ตารางที่ 1 (ต่อ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} ของสารสกัดในแต่ละการทดลอง

Run	Factors					TPC (mg GAE/g) Experimental (Predicted)	TFC (mg RE/g) Experimental (Predicted)	FRAP (mg TE/g) Experimental (Predicted)	ABTS ^{•+} (mg TE/g) Experimental (Predicted)
	A	B	C	D	E				
28	80	90	0.2	2.5	50	14.36(14.13)	14.24(13.84)	20.98(20.91)	13.45(13.61)
29	40	70	0.6	2.5	50	13.41(13.63)	20.59(20.16)	22.49(23.18)	14.03(14.53)
30	80	70	0.6	2.5	50	17.88(17.48)	29.52(28.59)	30.84(30.80)	20.25(19.86)
31	40	90	0.6	2.5	50	11.89(12.12)	8.23(9.76)	19.94(20.33)	10.86(10.97)
32	80	90	0.6	2.5	50	17.46(16.71)	14.79(14.63)	27.26(26.63)	14.75(15.10)
33	20	80	0.4	2.0	40	8.12(7.30)	18.54(17.08)	12.85(11.88)	7.74(7.27)
34	100	80	0.4	2.0	40	12.33(13.48)	24.85(25.59)	20.05(21.57)	13.07(13.04)
35	60	60	0.4	2.0	40	12.34(12.93)	23.74(23.39)	22.25(22.34)	15.06(14.62)
36	60	100	0.4	2.0	40	11.74(11.48)	2.04(1.67)	16.28(16.73)	7.48(7.43)
37	60	80	0.0	2.0	40	8.11(8.44)	9.84(10.28)	12.86(12.90)	11.55(11.80)
38	60	80	0.8	2.0	40	12.23(12.23)	13.47(12.30)	20.98(21.49)	13.11(12.36)
39	60	80	0.4	1.0	40	10.77(10.87)	15.34(14.52)	16.89(17.96)	11.15(10.86)
40	60	80	0.4	3.0	40	12.26(12.49)	16.55(16.64)	21.65(21.13)	13.87(13.66)
41	60	80	0.4	2.0	20	8.75(8.61)	9.42(8.12)	14.33(14.04)	9.12(8.58)
42	60	80	0.4	2.0	60	14.52(14.98)	16.14(16.71)	25.13(25.97)	16.62(16.66)
43	60	80	0.4	2.0	40	11.14(11.03)	16.36(15.46)	17.61(17.75)	12.02(12.22)
44	60	80	0.4	2.0	40	10.73(11.03)	14.92(15.46)	17.22(17.75)	12.74(12.22)
45	60	80	0.4	2.0	40	10.83(11.03)	14.89(15.46)	18.21(17.75)	12.12(12.22)
46	60	80	0.4	2.0	40	11.14(11.03)	14.72(15.46)	18.07(17.75)	12.56(12.22)
47	60	80	0.4	2.0	40	11.01(11.03)	15.86(15.46)	17.55(17.75)	12.44(12.22)
48	60	80	0.4	2.0	40	11.76(11.03)	14.16(15.46)	18.00(17.75)	11.67(12.22)
49	60	80	0.4	2.0	40	11.15(11.03)	15.83(15.46)	18.54(17.75)	11.98(12.22)
50	60	80	0.4	2.0	40	10.83(11.03)	16.24(15.46)	17.31(17.75)	11.70(12.22)

หมายเหตุ A คือ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (1 กรัมต่อ A มิลลิลิตร) โดยที่ A คือปริมาตรของเอทานอล, B คือ ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์), C คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (เปอร์เซ็นต์), D คือ เวลาในการสกัด (ชั่วโมง) และ E คือ อุณหภูมิในสกัด (องศาเซลเซียส)



2. ผลของการวิเคราะห์คุณภาพและความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ผลของการตรวจสอบคุณภาพ และความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 50 การทดลอง แสดงดังภาพที่ 1 การตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการแจกแจงปกติหรือไม่ พบว่าข้อมูลของ TPC (ภาพที่ 1a), TFC (ภาพที่ 1d), FRAP (ภาพที่ 1g) และ ABTS^{•+} (ภาพที่ 1j) มีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง สามารถอธิบายได้ว่าส่วนตกค้างของข้อมูลของ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} มีการแจกแจงแบบปกติ ในขณะที่ภาพ 1b, 1e, 1h และ 1k เป็นการตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างต่อค่าที่ถูกทำนายของ TPC (ภาพที่ 1b), TFC (ภาพที่ 1e), FRAP (ภาพที่ 1h) และ ABTS^{•+} (ภาพที่ 1k) พบว่ามีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 50 การทดลอง มีความเสถียรภาพของความแปรปรวน และสุดท้าย คือ การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล โดยใช้กราฟของค่าส่วนตกค้างต่อลำดับการทดลอง พบว่าส่วนตกค้างของข้อมูล TPC (ภาพที่ 1c), TFC (ภาพที่ 1f), FRAP (ภาพที่ 1i) และ ABTS^{•+} (ภาพที่ 1l) มีการกระจายตัวแบบไร้รูปแบบ แสดงให้เห็นถึงความเป็นอิสระของข้อมูล ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าข้อมูลของ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} ที่ได้จากการทดลองทั้ง 50 การทดลองเป็นข้อมูลที่มีคุณภาพ และมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+}

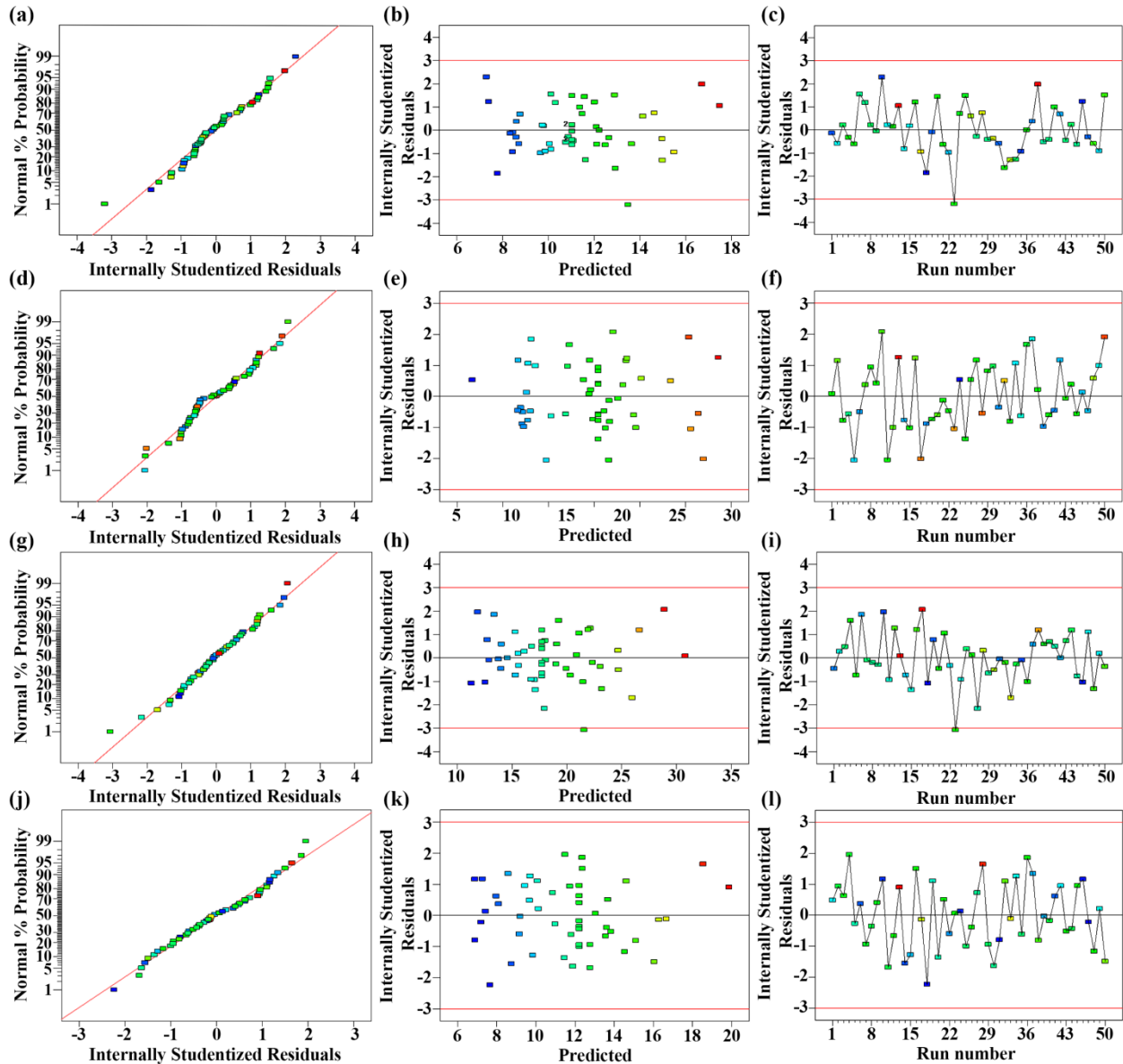
เมื่อนำข้อมูลของ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} ทั้ง 50 การทดลอง (ตารางที่ 1) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Design-Expert Version 8.0.3 trial พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสองมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของ เอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในสกัด (E) กับผลตอบสนอง (ได้แก่ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+}) และสามารถนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ดังสมการที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ

$$\text{TPC}_{(\text{mg GAE/g})} = 11.03 + 1.55A - 0.36B + 0.95C + 0.40D + 1.59E + 0.18AB + 0.081AC + 0.095AD + 0.39AE - 0.069BC - 0.064BD - 0.076BE + 0.065CD + 0.27CE + 0.37DE - 0.16A^2 + 0.29B^2 - 0.17C^2 + 0.16D^2 + 0.19E^2 \quad (2)$$

$$\text{TFC}_{(\text{mg RE/g})} = 15.46 + 2.13A - 5.43B + 0.50C + 0.53D + 2.15E - 0.89AB - 0.098AC + 0.016AD + 1.28AE - 0.34BC + 0.23BD - 0.54BE + 0.14CD + 0.19CE + 0.35DE + 1.47A^2 - 0.73B^2 - 1.04C^2 + 0.030D^2 - 0.76E^2 \quad (3)$$

$$\text{FRAP}_{(\text{mg TE/g})} = 17.75 + 2.42A - 1.40B + 2.15C + 0.79D + 2.98E - 0.33AB + 0.24AC + 0.17AD + 0.65AE - 0.097BC + 3.438 \times 10^{-3}BD - 0.26BE + 0.068CD + 0.50CE - 0.073DE - 0.26A^2 + 0.45B^2 - 0.14C^2 + 0.45D^2 + 0.56E^2 \quad (4)$$

$$\text{ABTS}^{\bullet+}_{(\text{mg TE/g})} = 12.22 + 1.44A - 1.80B + 0.14C + 0.70D + 2.02E - 0.30AB + 0.16AC + 0.36AD + 0.40AE + 0.039BC - 0.094BD - 0.23BE + 0.27CD + 0.13CE + 0.37DE - 0.51A^2 - 0.30B^2 - 0.034C^2 + 0.011D^2 + 0.10 E^2 \quad (5)$$



ภาพที่ 1 กราฟการกระจายแบบปกติของส่วนตกค้างของข้อมูล TPC, TFC, FRAP และ $ABTS^{+\bullet}$ (a, d, g และ j)

กราฟค่าส่วนตกค้างต่อค่าที่ถูกทำนายของ TPC, TFC, FRAP และ $ABTS^{+\bullet}$ (b, e, h และ k) และกราฟของค่าส่วนตกค้างต่อลำดับการทดลองของข้อมูล TPC, TFC, FRAP และ $ABTS^{+\bullet}$ (c, f, i และ l)

2.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสม และคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ตามสมการที่ 2-5 โดยการตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะใช้ค่าโมเดล (Model) และค่าความสมรูป (Lack of fit) แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าค่าโมเดลของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ TPC, TFC, FRAP และ $ABTS^{+\bullet}$ มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า $p < 0.0001$ ในทุกแบบจำลอง และเมื่อตรวจสอบความสมรูปของแบบจำลองทาง



คณิตศาสตร์ (สมการที่ 2-5) พบว่าทุกแบบจำลองไม่ขาดความเหมาะสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และมีค่าเท่ากับ 0.0645, 0.2201, 0.0814 และ 0.1008 ตามลำดับ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 2-5 สามารถใช้ทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

Source	TPC (mg GAE/g)			TFC (mg RE/g)			FRAP (mg TE/g)			ABTS ⁺⁺ (mg TE/g)		
	C.E.	S.E.	P-value	C.E.	S.E.	P-value	C.E.	S.E.	P-value	C.E.	S.E.	P-value
Model	11.03	0.18	<0.0001	15.46	0.35	<0.0001	17.75	0.25	<0.0001	12.22	0.20	<0.0001
A	1.55	0.082	<0.0001	2.13	0.16	<0.0001	2.42	0.11	<0.0001	1.44	0.092	<0.0001
B	-0.36	0.082	0.0001	-5.43	0.16	<0.0001	-1.40	0.11	<0.0001	-1.80	0.092	<0.0001
C	0.95	0.082	<0.0001	0.50	0.16	0.0038	2.15	0.11	<0.0001	0.14	0.092	0.1383
D	0.40	0.082	<0.0001	0.53	0.16	0.0025	0.79	0.11	<0.0001	0.70	0.092	<0.0001
E	1.59	0.082	<0.0001	2.15	0.16	<0.0001	2.98	0.11	<0.0001	2.02	0.092	<0.0001
AB	0.18	0.092	0.0530	-0.89	0.18	<0.0001	-0.33	0.13	0.0150	-0.30	0.10	0.0061
AC	0.081	0.092	0.3865	-0.098	0.18	0.5882	0.24	0.13	0.0671	0.16	0.10	0.1314
AD	0.095	0.092	0.3088	0.016	0.18	0.9311	0.17	0.13	0.1880	0.36	0.10	0.0016
AE	0.39	0.092	0.0002	1.28	0.18	<0.0001	0.65	0.13	<0.0001	0.40	0.10	0.0005
BC	-0.069	0.092	0.4594	-0.34	0.18	0.0645	-0.097	0.13	0.4508	0.039	0.10	0.7069
BD	-0.064	0.092	0.4883	0.23	0.18	0.2156	3.438x10 ⁻³	0.13	0.9785	-0.094	0.10	0.3681
BE	-0.076	0.092	0.4125	-0.54	0.18	0.0052	-0.26	0.13	0.0505	-0.23	0.10	0.0353
CD	0.065	0.092	0.4841	0.14	0.18	0.4330	0.068	0.13	0.5955	0.27	0.10	0.0134
CE	0.27	0.092	0.0071	0.19	0.18	0.2978	0.50	0.13	0.0004	0.13	0.10	0.2111
DE	0.37	0.092	0.0004	0.35	0.18	0.0605	-0.073	0.13	0.5655	0.37	0.10	0.0012
A ²	-0.16	0.092	0.0899	1.47	0.18	<0.0001	-0.26	0.13	0.0527	-0.51	0.10	<0.0001
B ²	0.29	0.092	0.0034	-0.73	0.18	0.0003	0.45	0.13	0.0013	-0.30	0.10	0.0070
C ²	-0.17	0.092	0.0668	-1.04	0.18	<0.0001	-0.14	0.13	0.2847	-0.034	0.10	0.7457
D ²	0.16	0.092	0.0885	0.030	0.18	0.8693	0.45	0.13	0.0013	0.011	0.10	0.9132
E ²	0.19	0.092	0.0455	-0.76	0.18	0.0002	0.56	0.13	0.0001	0.10	0.10	0.3329
Lack of fit = 0.0645			Lack of fit = 0.2201			Lack of fit = 0.0814			Lack of fit = 0.1008			
R ² = 0.9714			R ² = 0.9837			R ² = 0.9844			R ² = 0.9777			
Adjusted R ² = 0.9517			Adjusted R ² = 0.9725			Adjusted R ² = 0.9737			Adjusted R ² = 0.9623			
C.V.% = 4.60			C.V.% = 6.93			C.V.% = 3.84			C.V.% = 5.00			

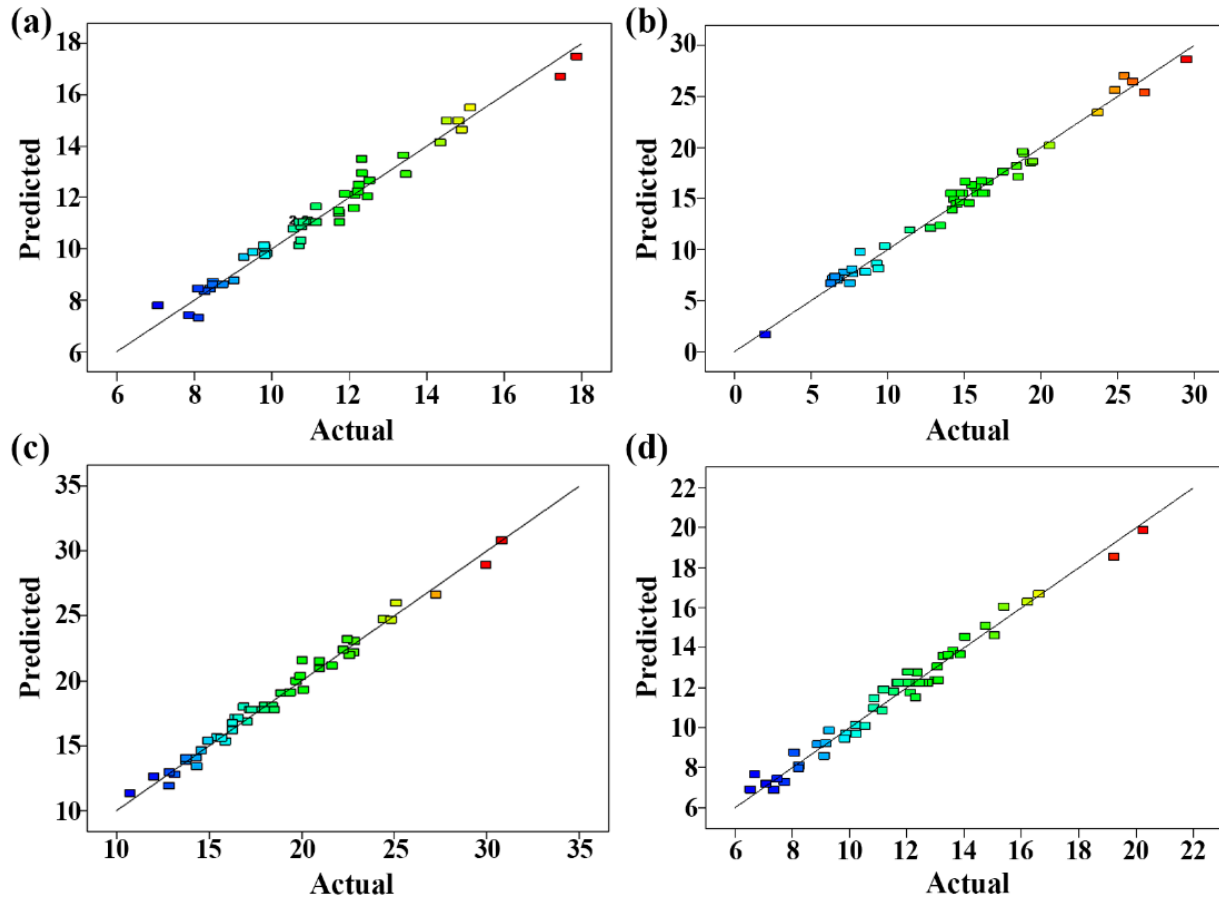
Coefficient Estimate (C.E.), Standard Error (S.E.)



ส่วนคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ สามารถประเมินได้จากค่า R^2 , adjusted R^2 และ C.V.% แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9714, 0.9837, 0.9844 และ 0.9777 ตามลำดับ สามารถอธิบายได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริงเข้ากันได้กับข้อมูลที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เท่ากับ 97.14, 98.37, 98.44 และ 97.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ จะได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นเอทานอล (B) ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในสกัด (E) เท่ากับ 97.14, 98.37, 98.44 และ 97.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเพียง 2.86, 1.63, 1.56 และ 2.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เป็นผลมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

ความแม่นยำของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ พิจารณาจากค่า adjusted R^2 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.9517, 0.9725, 0.9737 และ 0.9623 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สามารถอธิบายได้ว่าการทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 2-5 มีความแม่นยำถึง 95.17, 97.25, 97.37 และ 96.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับภาพที่ 2 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล TPC (ภาพที่ 2a), TFC (ภาพที่ 2b), FRAP (ภาพที่ 2c) และ ABTS⁺⁺ (ภาพที่ 2d) ที่ได้จากการทดลองจริง (Actual) กับค่าที่ได้จากการทำนาย (Predicted) ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่ามีแนวโน้มเข้าใกล้แนวของเส้นทแยงมุม แสดงว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 2-5 สามารถใช้ทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ ได้อย่างแม่นยำ ส่วนค่า C.V. (%) พบว่ามีค่าต่ำเท่ากับ 4.60, 6.93, 3.84 และ 5.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนาย และค่าที่ได้จากการทดลองจริงมีความแตกต่างกันน้อยมาก ดังนั้นจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าความสมบูรณ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์นั้นมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ

การวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยพหุคูณของปัจจัยทั้ง 5 ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในสกัด (E) ในสมการที่ 2-5 นั้นว่ามีอิทธิพลต่อค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ หรือไม่ โดยพิจารณาในส่วนของพจน์เชิงเส้น พจน์อิทธิพลร่วมกัน และพจน์กำลังสอง แสดงดังตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สมการที่ 2 สำหรับทำนายค่า TPC พบว่าพจน์ A, B, C, D, E, AE, CE, DE, B² และ E² มีอิทธิพลต่อการสกัด TPC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่พจน์ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สมการที่ 3 สำหรับทำนายค่า TFC พบว่าพจน์ A, B, C, D, E, AB, AE, BE, A², B², C² และ E² มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อการสกัด TFC ส่วนพจน์ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สมการที่ 4 สำหรับทำนายค่า FRAP พบว่าพจน์ A, B, C, D, E, AB, AE, CE, B², D² และ E² มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพจน์ในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สมการที่ 5 สำหรับทำนายค่า ABTS⁺⁺ พบว่า A, B, D, E, AB, AD, AE, BE, CD, DE, A² และ B² เป็นพจน์ที่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS⁺⁺ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และปัจจัยในพจน์อื่น ๆ เป็นพจน์ที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ต่อค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC (a), TFC (b), FRAP (c) และ ABTS⁺ (d) ที่ได้จากการทำนาย (Predicted) กับค่าที่ได้จากการทดลองจริง (Actual)

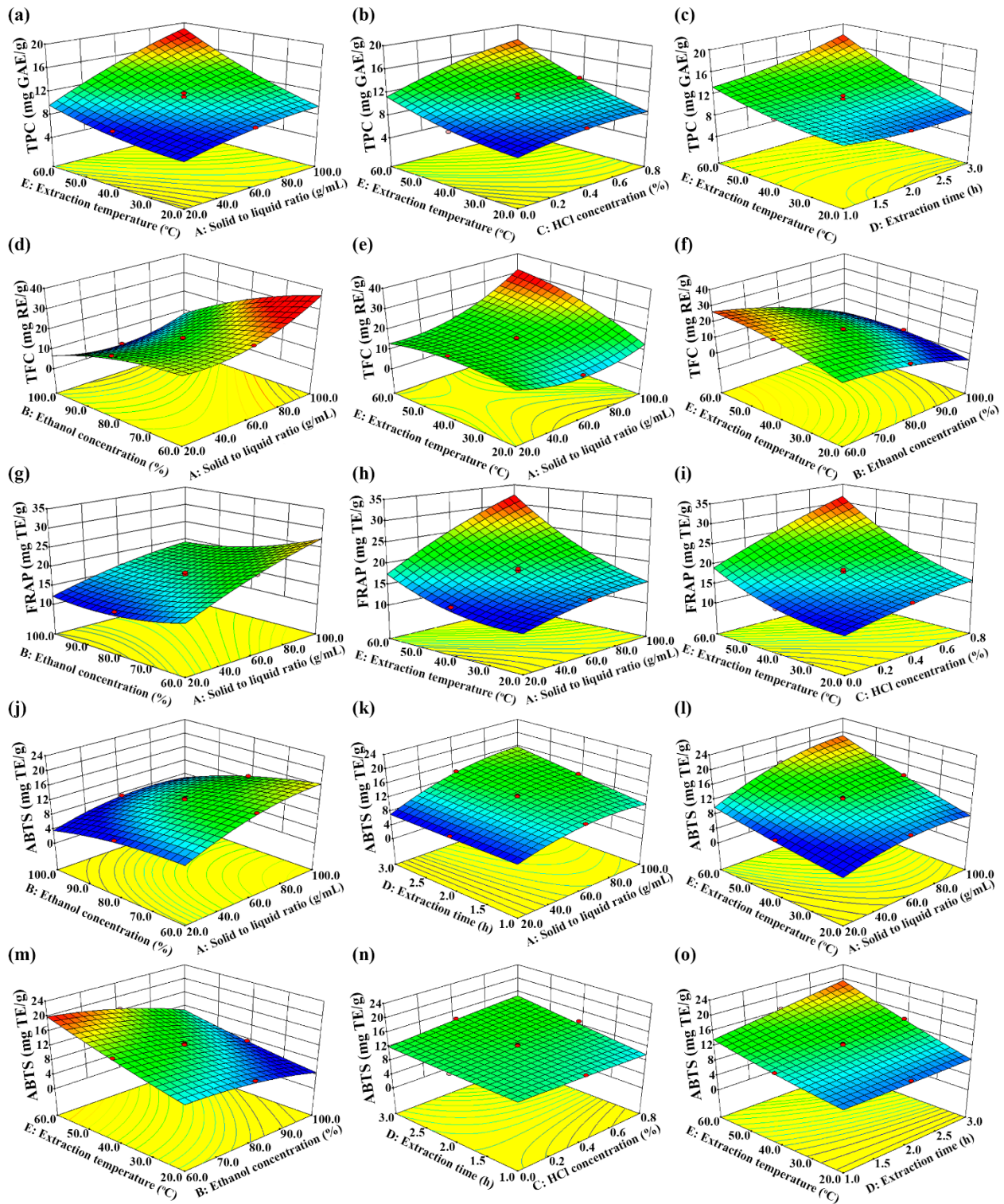
2.4 ผลของการสร้างพื้นผิวตอบสนองจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 2-5 สามารถนำมาพล็อตกราฟพื้นผิว 3 มิติ (3D-surface plot) เพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในการสกัด (E) กับผลตอบสนอง TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺ แสดงดังภาพที่ 3 โดยภาพที่ 3a, 3d, 3e, 3g, 3h, 3j, 3k, และ 3l แสดงอิทธิพลร่วมกันของ AB, AD และ AE ที่มีผลต่อค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺ เมื่อปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับกลาง พบว่าที่อัตราส่วนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ 1 กรัมต่อปริมาตรเอทานอลเท่ากับ 80.0 มิลลิลิตร เมื่อลดความเข้มข้นของเอทานอลจาก 100.0 เป็น 70.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3d, 3g และ 3j) ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 20.0 เป็น 50.0 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3a, 3e, 3h และ 3l) และเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 1.0 เป็น 2.5 ชั่วโมง (ภาพที่ 3k) มีผลทำให้การสกัด TPC, TFC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการลดความเข้มข้นของเอทานอลร่วมกับการเพิ่มอัตราส่วนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล เวลาที่ใช้ในการสกัด และอุณหภูมิในการสกัดมากกว่านี้ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณ TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺

ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู (ภาพที่ 3a, 3d, 3e, 3g, 3h, 3j, 3k, และ 3l) ในขณะที่ภาพ 3f และ 3m แสดงผลของอิทธิพลร่วมกันของ BE ต่อปริมาณ TFC ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS^{•+} เมื่อปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับกลาง พบว่าการลดความเข้มข้นของเอทานอลจาก 100.0 เป็น 70.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 20.0 เป็น 50.0 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณ TFC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS^{•+} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าเท่ากับ 28.32 mg RE/g และ 19.70 mg TE/g ตามลำดับ ส่วนภาพที่ 3b, 3i และ 3n แสดงอิทธิพลร่วมกันของ CE และ CD ที่มีผลต่อค่า TPC, FRAP และ ABTS^{•+} เมื่อปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับกลาง พบว่าค่า TPC, FRAP และ ABTS^{•+} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิในการสกัด และเวลาที่ใช้ในการสกัด เช่นเดียวกับภาพที่ 3c และ 3o แสดงอิทธิพลร่วมกันของ DE ต่อค่า TPC และ ABTS^{•+} เมื่อปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับกลาง พบว่าการเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 1.0 เป็น 2.5 ชั่วโมง ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 20.0 เป็น 50.0 องศาเซลเซียส ช่วยเพิ่มการสกัด TPC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS^{•+} แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิมากกว่านี้ไม่ส่งผลให้ค่า TPC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS^{•+} เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3c และ 3o)

3. ผลการศึกษาความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ผลของการศึกษาความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยการวิเคราะห์หierarchyระดับของแต่ละปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในการสกัด (E) ที่เหมาะสมต่อการสกัด TPC, TFC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} สูงสุดภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองจริง และค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อยืนยันผลของการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าสภาวะของการสกัดที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} สูงสุดประกอบด้วยปัจจัย A อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล คือ 1 กรัมต่อ 80 มิลลิลิตร ปัจจัย B ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัย C ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัย D เวลาที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 2.5 ชั่วโมง และปัจจัย E อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดนี้ พบว่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} มีค่าเท่ากับ 17.80 mg GAE/g, 29.28 mg RE/g, 30.52 mg TE/g และ 20.24 mg TE/g ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองตามสมการที่ 2-5 (17.48 mg GAE/g, 28.59 mg RE/g, 30.80 mg TE/g และ 19.86 mg TE/g ตามลำดับ) และเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% Error) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.83, 2.41, 0.91 และ 1.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 10 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D-surface plot) ของอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อค่า TPC, TFC ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} ของสารสกัด



วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณ TPC, TFC ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} พบว่าปัจจัยที่ใช้ในการสกัดทั้ง 5 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในการสกัด (E) เป็นปัจจัยมีผลเกี่ยวเนื่องและสัมพันธ์กัน โดยจากการทดลองทั้ง 50 การทดลอง พบว่ามีค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} สูงสุด คือ การทดลองที่ 30 มีค่าเท่ากับ 17.88 mg GAE/g, 29.52 mg RE/g, 30.84 mg TE/g และ 20.25 mg TE/g ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองที่ 3 (TPC และ FRAP), 7 (ABTS^{•+}) และ 36 (TFC) มีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ 7.07 mg GAE/g, 10.74 mg TE/g, 6.55 mg TE/g และ 2.04 mg RE/g ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการสกัด TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย FRAP และ ABTS^{•+} เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Itankar *et al.* (2011) ที่รายงานว่สารสกัดจากผลอ่อนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (unripe *Carissa carandas*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 15.8 และ 18.55 mg GAE/g ตามลำดับ และฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2.92 และ 1.534 mg RE/g ตามลำดับ เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตท และมีค่าใกล้เคียงกับค่า TPC ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ ในขณะที่ปริมาณ TFC ที่สกัดด้วยวิธี RSM จะมากกว่าในงานวิจัยของ Itankar *et al.* (2011) ซึ่งปริมาณของ TPC และ TFC ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของวัตถุดิบและวิธีการสกัด

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD สามารถสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีคุณภาพและมีความเหมาะสม เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานดังต่อไปนี้ คือ (1) ส่วนตกค้างของข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ข้อมูลมีความเสถียรภาพของความแปรปรวน และ (3) ข้อมูลมีความเป็นอิสระต่อกัน สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Lee *et al.* (2011) และ Chanpirak *et al.* (2018) พบว่าข้อมูลที่มีคุณภาพและมีความเหมาะสมต้องเป็นไปตามสมมติฐานดังกล่าว และเมื่อพิจารณาผลสรุปทางสถิติของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยการพิจารณาจากค่า R^2 พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสองเป็นรูปแบบที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าปัจจัยต่าง ๆ กับค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} เนื่องจากมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9714-0.9844 สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Jiang *et al.* (2017) พบว่าค่า R^2 เป็นค่าที่ใช้เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งแบบจำลองที่ดีควรมีค่า R^2 เข้าใกล้ 1.0 จากการตรวจสอบคุณภาพและความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2-5 โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและพิจารณาค่าโมเดล ค่าความสมบูรณ์ R^2 , adjusted R^2 และ C.V.% พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2-5 มีคุณภาพและความเหมาะสม เนื่องจากค่าโมเดลของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} มีค่า $p < 0.05$ และค่าความสมบูรณ์ในทุกแบบจำลองมีค่า $p > 0.05$ ในขณะที่คุณภาพพิจารณาจากค่า R^2 และ adjusted R^2 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.9714-0.9844 และ 0.9517-0.9737 ตามลำดับ และมีค่า C.V. (%) อยู่ในช่วง 3.84-6.93 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองเข้ากันได้กับข้อมูลที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2-5 ซึ่งมีแม่นยำและมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะมีคุณภาพต้องมีค่า R^2 และ adjusted R^2 เข้าใกล้ 1 มากที่สุด และมีค่า C.V. (%) ต่ำ (Jiang *et al.*, 2017; Swamy *et al.*, 2018)

เมื่อพิจารณากราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของ 3 มิติของ TPC และ TFC ที่สกัดได้จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} ของสารสกัด โดยศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ใช้ในการสกัด ทั้ง 5 ปัจจัย พบว่าค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอลจาก 1 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตร เป็น 1 กรัมต่อ 80 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกจาก 0.0 เป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 20.0 เป็น 50.0 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Ryu & Koh (2018) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณ TPC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS^{•+} จากถั่วดำ (*Glycine max* [L.] Merr. Cheongja4ho) พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของถั่วดำต่อน้ำจาก 1 กรัมต่อ 23.2 มิลลิลิตร เป็น 1 กรัมต่อ 54.2 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกจาก 0.232 เป็น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 23.2 เป็น 56.8 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การสกัด TPC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS^{•+}) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าเท่ากับ 1197.09 และ 211.56 mg GAE/100 g ตามลำดับ ส่วน Belwal *et al.* (2016) พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนจาก 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร เป็น 1 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 30.0 เป็น 50.0 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การสกัด TPC, TFC และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP และ ABTS^{•+}) จากผล *Berberis asiatica* มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องมาจากปริมาตรของตัวทำละลายเอทานอลและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการแพร่ (Diffusion rate) การถ่ายโอนมวล (Mass transfer) และประสิทธิภาพของการละลาย (Solubility) เพิ่มขึ้น (Cacace & Mazza, 2003; Al-Farsi & Lee, 2008; Wang *et al.*, 2008) ส่วนการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS^{•+} โดยการเพิ่มขึ้นจาก 1.0 เป็น 2.5 ชั่วโมง พบว่ามีผลทำให้ปริมาณ TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สารพฤกษเคมีที่มีอยู่ในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่เกิดการแพร่หรือการถ่ายเทมวลสารที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้ TPC และ TFC ถูกสกัดและแพร่ออกมาในตัวทำละลายได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP และ ABTS^{•+}) ที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Hong *et al.* (2017) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 20 เป็น 100 นาที มีผลทำให้การสกัดกรดไฟติก (phytic acid) จากกากถั่วลิสง (peanut meal) เพิ่มขึ้น ส่วน Ge *et al.* (2014) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจาก 1.50 เป็น 2.11 ชั่วโมง มีผลทำให้การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Herba lophatheri* เพิ่มขึ้นเช่นกัน ในขณะที่การสกัดสารพฤกษเคมีจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพูโดยการลดความเข้มข้นของเอทานอลลงจาก 100 เป็น 70 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ปริมาณ TPC, TFC และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS^{•+} เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Buachoon (2018) พบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารพฤกษเคมี (สารประกอบฟีนอลิกและแทนนิน) จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ รองลง คือ น้ำ และเมทานอล ตามลำดับ สามารถสกัด TPC ได้เท่ากับ 41.27, 30.78 และ 25.94 mg GAE/g ตามลำดับ ส่วน Ilaiyaraja *et al.* (2015) ได้ศึกษาสภาวะของการสกัดที่เหมาะสมต่อปริมาณสารโพลีฟีนอล และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS ใน *Feronia limonia* (wood apple) ด้วยวิธี RSM พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม คือ 62.7 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ได้มีปริมาณ TPC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.21 mg GAE/g และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วย DPPH และ ABTS^{•+} เท่ากับ 81.60 และ 85.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺⁺ จากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู (ผลดิบ) ด้วยตัวทำละลายเอทานอลในสภาวะกรดโดยวิธี RSM ร่วมกับการวางแผนการทดลองแบบ CCD จำนวน 5 ระดับ (-2, -1, 0, +1 และ +2) และ 5 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล (A) ความเข้มข้นของเอทานอล (B) ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (C) เวลาที่ใช้ในการสกัด (D) และอุณหภูมิในการสกัด (E) จำนวน 50 การทดลอง พบว่า A, B, C, D และ E เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการสกัด TPC, TFC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺⁺ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสามารถแสดงได้ในรูปของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กำลังสองสำหรับทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9714, 0.9837, 0.9844 และ 0.9777 ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่าระดับของปัจจัยทั้ง 5 พบว่าสภาวะของการสกัดที่เหมาะสมประกอบด้วยอัตราส่วนระหว่างมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อเอทานอล 1:80 กรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.6 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ในการสกัด 2.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิในการสกัด 50 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถสกัด TPC และ TFC ได้เท่ากับ 17.80 mg GAE/g และ 29.28 mg RE/g ตามลำดับ และเมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ ABTS⁺⁺ มีค่าเท่ากับ 30.52 และ 20.24 mg TE/g ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และมีค่าความผิดพลาดอยู่ในช่วง 0.91-2.41 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากวิธี RSM สามารถใช้ทำนายค่า TPC, TFC, FRAP และ ABTS⁺⁺ ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลสีเขียวชมพู

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Al-Farsi, M.A., & Lee, C.Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 108, 977-985.
- Arif, M., Fareed, S., Hussain, T., & Ali, M. (2013). Adaptogenic activity of lanostane triterpenoid isolated from *Carissa carandas* fruit against physically and chemically challenged experimental mice. *Pharmacognosy Journal*, 5(5), 216-220.
- Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I.D., Rawal, R.S., & Pande, V. (2016). Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 207, 115-124.



- Buachoon, N. (2018). Antioxidant activity and total phenolic from seed and fruits of *Carissa carandas*. *VRU Research and Development Journal Science and Technology*, 13(2), 53-63. (in Thai)
- Cacace, J.E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.
- Chanpirak, A., Dumnin, P. & Hongpuay, A. (2018). Optimization of oil extraction from spent coffee grounds (*Coffea canepgora var. Robusta/Coffea arabica*) by hexane using response surface methodology. *The Journal of KMUTNB*, 28(4), 799-811. (in Thai)
- Chen, S., Zeng, Z., Hu, N., Bai, B., Wang, H. & Suo, Y. (2018). Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. Fruit using response surface methodology. *Food Chemistry*, 242, 1-8.
- Dhodi, J.B., Thanekar, D.R., Mestry, S.N., & Juvekar, A.R. (2015). *Carissa carandas* Linn. fruit extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats via attenuation of oxidative stress. *Journal of Acute Disease*, 4(2), 135-140.
- Ge, Q., Huang, J., Mao, J-W., Gong, J-Y., Zhou, Y-F., & Huang, J-X. (2014). Optimization of total polysaccharide extraction from *Herba Lophatheri* using RSM and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 37-42.
- Gupta, P., Bhatnagar, I., Kim, S-K., Verma, A.K., & Sharma, A. (2014). In-vitro cancer cell cytotoxicity and alpha amylase inhibition effect of seven tropical fruit residues. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), s665-s671.
- Hong, R., Ting, L., & Huijie, W. (2017). Optimization of extraction condition for phytic acid from peanut meal by response surface methodology. *Resource-Efficient Technologies*, 3, 226-231.
- Ilaiyaraja, N., Likhith, K.R., Babu, G.R.S. & Khanum, F. (2015). Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 173, 348-354.
- Itankar, P.R., Lokhande, S.J., Verma, P.R., Arora, S.K., Sahu, R.A., & Patil, A.T. (2011). Antidiabetic potential of unripe *Carissa carandas* Linn. fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 430-433.
- Jiang, H.L., Yang, J.L., & Shi, Y.P. (2017). Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 325-331.
- Kishimoto, Y., Saito, N., Kurita, K., Shimokado, K., Maruyama, N., & Ishigami, A. (2013). Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, 579-584.



- Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126(3), 972-981.
- Lee, H.V., Yunus, R., Juan, J.C., & Taufiq-Yap, Y.H. (2011). Process optimization design for jatropha-based biodiesel production using response surface methodology. *Fuel Processing Technology*, 92, 2420-2428.
- Nuengchamngong, N., & Ingkaninan, K. (2010). On-line HPLC–MS–DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. *Food Chemistry*, 118(1), 147-152.
- Panghal, A., Kaur, R., Janghu, S., Sharma, P., Sharma, P., & Chhikara, N. (2019). Nutritional, phytochemical, functional and sensorial attributes of *Syzygium cumini* L. pulp incorporated pasta. *Food Chemistry*, 289, 723-728.
- Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. *Thai Science and Technology Journal*, 21(3), 275-286. (in Thai)
- Ryu, D., & Koh, E. (2018). Application of response surface methodology to acidified water extraction of black soybeans for improving anthocyanin content, total phenols content and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 261, 260-266.
- Sarkar, R., Kundu, A., Banerjee, K., & Saha, S. (2018). Anthocyanin composition and potential bioactivity of karonda (*Carissa carandas* L.) fruit: An Indian source of biocolorant. *LWT*, 93, 673-678.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59, 211-218.
- Swamy, G.J., Sangamithra, A., & Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.
- Wang, J., Sun, B.G., Cao, Y.P., Tian, Y., & Li, X.H. (2008). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804-810.